

钱荷英,张月华,郭锡杰,等. 家蚕斑纹突变基因(*q*)的 SSR 标记定位分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):15-18.

# 家蚕斑纹突变基因(*q*)的 SSR 标记定位分析

钱荷英<sup>1,2</sup>, 张月华<sup>1,2</sup>, 郭锡杰<sup>1</sup>, 王小强<sup>1,2</sup>, 孙平江<sup>2</sup>, 徐安英<sup>1</sup>

(1. 江苏科技大学, 江苏镇江 212003; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

**摘要:**对家蚕幼虫斑纹突变基因(*q*)进行分子标记定位,有助于对性状的分子标记辅助选择和对该基因的定位克隆研究。利用家蚕雌性染色体在减数分裂过程中不发生交换的特点,采用幼虫斑纹为鹌斑(*q*)的家蚕品系 g03 和幼虫斑纹为素斑(*p*)的家蚕品系 C108,组配正反交群体 g03 ♀ × (g03 × C108) F<sub>1</sub> ♂ 和 (g03 × C108) F<sub>1</sub> ♀ × g03 ♂,分别记作 BC<sub>1</sub>M 和 BC<sub>1</sub>F。用已经构建的家蚕 SSR 分子标记连锁图谱中第 7 连锁群上的 12 对 SSR 标记引物在亲本间进行多态性筛选。BC<sub>1</sub>F 群体中的普斑个体均表现出与 (g03 × C108) F<sub>1</sub> 相同的杂合型带型,而所有个体的带型与亲本 g03 一致,为纯合型。结果筛选出 S0703、S0707 和 S0710 共 3 个与 *q* 基因连锁的 SSR 标记。利用 BC<sub>1</sub>M 群体构建了家蚕 *q* 基因及其连锁的 SSR 标记遗传连锁图,图距为 18.0 cM,3 个 SSR 标记及 *q* 基因的排列次序为 S0703 - *q* - S0707 - S0710, *q* 位于 4.5 cM 处,与 *q* 基因最近的标记为 S0703,遗传距离为 4.5 cM。

**关键词:**家蚕;鹌斑基因;SSR 标记;基因定位;遗传连锁图

**中图分类号:**S881.2<sup>+</sup>6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0015-04

家蚕(*Bombyx mori*)作为鳞翅目昆虫的模式生物,其幼虫斑纹种类繁多,且易于检测和识别,是遗传学研究的绝好材料。鉴于各种斑纹间又可以相互合成复合斑纹,田中(1928)将斑纹划分为基础斑纹(能单独表现者)和附加斑纹(不能单独表现者)。在家蚕中通常把普通斑(+<sup>p</sup>, 2-0.0)作为幼虫斑纹正常型,表现为蚕体背面第 2 胸节有眼状纹,第 2 腹节有半月纹,第 5 腹节有星状纹。鹌斑基因(quaile, *q*, 7-0.0)是家蚕幼虫斑纹的突变基因之一,是第 7 染色体的标志基因,其性状表现为在普通斑表现的同时,蚕体背面覆盖破布状斑纹,半月纹和星状纹之后缘模糊,似有向后流动状,体表微红<sup>[1]</sup>。

昆虫的体色(斑纹和线条颜色)主要由真皮细胞和上表皮中色素<sup>[2]</sup>(黑色素、蝶啶和眼黄素)的性质、分布及相互作用形成。一直以来,关于昆虫体色系统的研究都是发育生物学和进化生物学的研究热点。近年来,根据对果蝇(*Drosophi-*

*la melanogaster*)体色系统的研究结果建立了有关黑色素代谢的关键通路,通路中涉及的酶在一些家蚕体色突变体中都找到了相应的表型<sup>[3-4]</sup>。Futahashi 等在 2008 年首先通过分析黑色素合成代谢通路的相关酶,发现家蚕 Yellow 蛋白的突变导致了赤蚁突变体(ch)的产生;而 *ebony* 基因的突变则导致了煤灰色突变体(so)的产生<sup>[5]</sup>。2010 年, Dai 等<sup>[6]</sup>和 Zhan 等<sup>[7]</sup>通过 SSR 连锁定位结合候选基因筛查的方法,独立证实了与 *ebony* 基因发挥平行作用的家蚕乙酰转移酶 NAT 的突变造成了家蚕暗化型(mln)突变。这也是在昆虫中首次发现由于 NAT 的缺失造成异常体表型。

另外, Ito 等于 2009 年发现家蚕的另一种突变体(ow)是由于该突变体的家蚕 Varp 蛋白在编码区有一个 25 bp 的插入造成的<sup>[8]</sup>; Meng 等发现了家蚕中墨喋呤还原酶的突变决定了家蚕黄色幼虫突变体(lemon)的产生<sup>[9]</sup>。以上 2 种突变体对应的基因均不在经典的昆虫黑色素代谢途径中<sup>[10]</sup>。因此,开展以家蚕体色系统为模型的研究,对于生物多样性与生物的选择进化研究是有力的补充。此外,开展家蚕斑纹突变的研究,对培育斑纹限性品种,提高蚕种生产的劳动效率,实现雌雄分养生产高品位的雄蚕茧丝具有重要的实用意义。

家蚕中基于形态学标记所构建的经典遗传图,包括家蚕各时期的体色、体形、斑纹、茧色、血色以及生理生化突变基因约 240 个<sup>[11]</sup>,是家蚕突变性状基因分子标记定位和功能研究、利用的基础。近年来,随着分子标记技术的快速发展,多

收稿日期:2013-03-12

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-22);

江苏省镇江市科技支撑计划(农业)项目(编号:NY2010026)。

作者简介:钱荷英(1971—),女,江苏溧阳人,硕士,副研究员,主要研究方向为家蚕遗传育种与分子生物学。Tel: (0511) 85616613; E-mail: qianheyin123@163.com。

通信作者:徐安英,女,研究员,硕士生导师,主要研究方向为家蚕物质资源与遗传育种。Tel: (0511) 85616575; E-mail: srixay@126.com。

[11] Chin H S, Sim J, Sim T S. Mutation of N304 to leucine in Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase creates an enzyme with increased penicillin analogue conversion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(2): 507-513.

[12] Ji J, Tian X, Fan K, et al. New strategy of site-directed mutagenesis identifies new sites to improve Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase activity toward penicillin G[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(6): 2395-2401.

[13] Goo K S, Chua C S, Sim T S. Relevant double mutations in bioengineered Streptomyces clavuligerus deacetoxycephalosporin C synthase result in higher binding specificities which improve penicillin bioconversion[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(4): 1167-1175.

[14] Ji J, Fan K, Tian X, et al. Iterative combinatorial mutagenesis as an effective strategy for generation of deacetoxycephalosporin C synthase with improved activity toward penicillin G[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(21): 7809-7812.

种家蚕分子遗传连锁图<sup>[12-14]</sup>以及家蚕基因组精细图的构建<sup>[15]</sup>,为家蚕突变基因的连锁分析和定位研究提供了强有力的工具。微卫星(SSR)存在于所有真核和原核生物基因组中,因其具有多态性高、共显性、孟德尔遗传、检测技术简单和检测结果稳定等优点<sup>[16]</sup>,已经被广泛应用于遗传图谱构建、基因定位、QTLs 分析和分子标记辅助育种等领域<sup>[17]</sup>。本研究采用幼虫斑纹为(*q*)的 *g03* 和幼虫斑纹为素斑(*p*)的 *C108* 等 2 个家蚕品系,组配正反交群体(*g03* × *C108*) × *g03* 和 *g03* × (*g03* × *C108*),根据已经构建的家蚕 SSR 分子标记遗传连锁图谱中的标记对 *q* 基因进行连锁及定位分析,为进一步对 *q* 基因进行定位克隆研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕品种为中国农业科学院蚕业研究所保存的 2 个品系 *g03* 和 *C108*。*g03* 的幼虫斑纹为鹌斑,基因型 +<sup>*p*</sup>+<sup>*p*</sup>/*qq*; *C108* 的幼虫斑纹为素斑,基因型 *pp*/+<sup>*q*</sup>+<sup>*q*</sup>。用 *g03* 和 *C108*

组配 *F*<sub>1</sub> 代及 *BC*<sub>1</sub> 回交群体,即(*g03* × *C108*) × *g03* 和 *g03* × (*g03* × *C108*),分别记作 *BC*<sub>1</sub>*F* 和 *BC*<sub>1</sub>*M*。单蛾区饲养亲本 *g03* 和 *C108*、*F*<sub>1</sub>、*BC*<sub>1</sub>*F* 和 *BC*<sub>1</sub>*M* 回交群体,5 龄壮蚕期调查斑纹,并将不同斑纹的个体分别储存于 -20 ℃ 冰箱中。由于家蚕雌性在减数分裂过程中染色体不发生交换,故 *BC*<sub>1</sub>*M* 用来进行重组作图,*BC*<sub>1</sub>*F* 用来进行连锁分析。亲本、*F*<sub>1</sub> 及回交群体的表型和基因型见图 1。

1.2 家蚕基因组 DNA 抽提

取 *g03* 和 *C108*、*F*<sub>1</sub>、*BC*<sub>1</sub>*F* 和 *BC*<sub>1</sub>*M* 回交群体的个体,抽提蚕的 DNA。用 D2004W 电动搅拌机将蚕体粉碎,其组织转移至预先加有家蚕 DNA 抽提缓冲液的 1.5 mL EP 管中。抽提缓冲液的组分:50 mmol/L 的 Tris - HCl (pH 值 8.0),100 mmol/L NaCl,20 mmol/L EDTA,150 μg/mL 的蛋白酶 K。50 ℃ 消化 6 ~ 8 h,加入 RNA 酶(终浓度 50 μg/mL),37 ℃ 保温 30 min,酚 - 氯仿抽提。用乙醇沉淀 DNA,最后将样品 DNA 溶解在 0.1 × TE (pH 值 8.0) 中,用分光光度计检测 DNA 的浓度及纯度,然后将 DNA 样品稀释为 10 ng/μL,20 ℃ 保存。

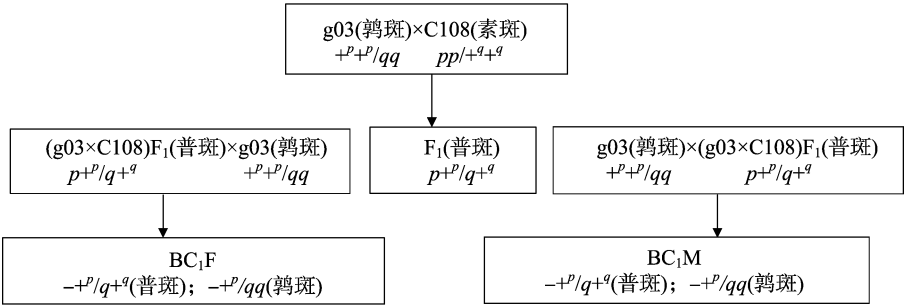


图1 亲本、*F*<sub>1</sub>及回交群体的基因型和表型

1.3 PCR 反应及扩增产物的检测

从已构建的家蚕 SSR 标记连锁图中<sup>[12]</sup>,选取第 7 连锁群上的 12 个 SSR 标记,以 2 个亲本为模板进行 PCR 扩增,筛选具有多态性的 SSR 标记。PCR 仪采用 Flexigene Cyclor。PCR 反应体系 (20 μL): 10 × PCR Buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.4, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2 μL, 0.2 mmol/L dNTP 0.4 μL, 50 μmol/L 的正反向引物各 0.2 μL, 5 U/μL DNA *Taq* 聚合酶 0.2 μL, 10 ng/μL 模板 DNA 0.2 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 20 μL。用 Touch - Down PCR 反应程序: 95 ℃ 预变性 3 min; 14 个 Touch - Down 循环, 94 ℃ 45 s, 退火温度由 63 ℃ 依次递减 0.5 ℃ 直到 56 ℃, 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 1 min; 24 个正常 PCR 反应循环 (94 ℃ 40 s, 56 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min), 72 ℃ 10 min。

PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测,估算出产物的浓度。再取 PCR 扩增产物约 0.5 ng,加入蓝色葡聚糖加样缓冲液,然后 95 ℃ 变性 3 min,迅速置冰上冷却,采用 ABI377 (ABI PRISM) 测序仪用 5% 的测序胶电泳检测。

1.4 SSR 标记的遗传连锁分析与作图

采用 Mapmaker 3.0<sup>[18]</sup> 作图软件,用三点作图法先初步定位每个具多态性的 SSR 标记,然后根据整个数据阵计算重组值 (LOD = 5.0),基于 Kosambi 方法<sup>[19]</sup> 进行多位点分析,绘制出连锁群上各标记间的次序和距离。

2 结果与分析

2.1 (*g03* × *C108*) *F*<sub>1</sub> × *g03* 回交群体的表现型与基因型

亲本 *g03* (鹌斑) 和 *C108* (素斑) 组配的 *F*<sub>1</sub> 代全部表现出普斑性状。*BC*<sub>1</sub>*M* 个体 (共 3 蛾区) 为 735 个,其中表现为普斑的个体有 372 个,表现为鹌斑的个体有 363 个。*BC*<sub>1</sub>*F* 个体共 376 个,其中普斑个体为 196 个,鹌斑个体为 180 个。计算卡平方值,由表 1 可见 *BC*<sub>1</sub>*F* 和 *BC*<sub>1</sub>*M* 群体中普斑和鹌斑性状符合 1 : 1 的分离比 (*P* > 0.05) (表 1)。

2.2 SSR 多态性标记的筛选

以 2 个亲本 (*g03*, *C108*) 和 *F*<sub>1</sub> (*g03* × *C108*) 个体的基因组 DNA 为模板,从已经公布的家蚕 SSR 分子遗传连锁图中

表 1 构建家蚕幼虫鹌斑基因 *q* SSR 标记遗传连锁图所用群体及其表型分离比

群体	交配方式	基因型	各种表型个体数 (个)		分离比	$\chi^2$	$\chi^2_{0.05}$
			鹌斑	普斑			
<i>BC</i> <sub>1</sub> <i>F</i>	( <i>g03</i> × <i>C108</i> ) × <i>g03</i>	- + <sup><i>p</i></sup> / <i>q</i> + <sup><i>q</i></sup> ; - + <sup><i>p</i></sup> / <i>qq</i>	180	196	1 : 1	0.68	$\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$
<i>BC</i> <sub>1</sub> <i>M</i>	<i>g03</i> × ( <i>g03</i> × <i>C108</i> )	- + <sup><i>p</i></sup> / <i>q</i> + <sup><i>q</i></sup> ; - + <sup><i>p</i></sup> / <i>qq</i>	363	372	1 : 1	0.11	$\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$

选取第 7 连锁群上的 12 个标记(S0701、S0702、S0703、S0704、S0705、S0706、S0707、S0708、S0709、S0710、S0711、S0712)进行 PCR 扩增,筛选多态性标记。共找到 3 个在 2 个亲本之间具有多态性的 SSR 标记,分别为 S0703、S0707、S0710(表 2)。

表 2 筛选到的与家蚕幼虫鹑斑基因 <i>q</i> 连锁的 SSR 标记	
标记符号	引物序列(5'→3')
S0703	CACTATTTGACCTCCCTGATGACG
	CGAACTCATTTATTGTCTTGGGG
S0707	CGGAATCGTGACCCACTAAGAA
	CCGGTTCATTTTCAGAACTGTGG
S0710	ACCTTCATAACAAACTTCCGTAGTAAAT
	TTCCACCTGATGGTTGTCTG

2.3 与家蚕 *q* 基因连锁的 SSR 多态性标记在 BC<sub>1</sub>F 群体中的扩增带型

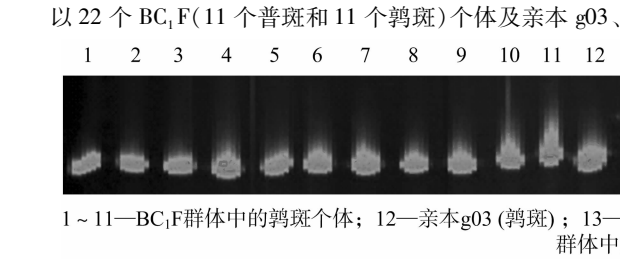


图2 与家蚕幼虫鹑斑基因*q*连锁的 SSR标记S0710 在 BC<sub>1</sub>F 群体中的扩增带型图谱

2.4 与家蚕鹑斑基因 *q* 连锁的 SSR 标记在 BC<sub>1</sub>M 群体中的扩增带型

用 186 个 BC<sub>1</sub>M 个体确定与 *q* 基因连锁的多态性引物顺序及遗传距离。其中 93 个为普斑个体,93 个为鹑斑个体。在统计条带时,188 个体中带型与 *q* 一致的记作“1”,与 F<sub>1</sub> 一致的记作“2”。如果没有发生交换,93 个鹑斑个体的带型应

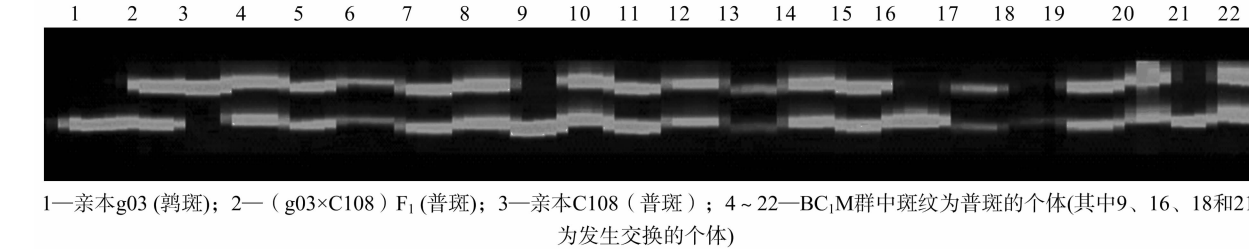


图3 与家蚕幼虫鹑斑基因*q*连锁的SSR标记S0710 在 BC<sub>1</sub>M 普斑群体中扩增的局部电泳图谱

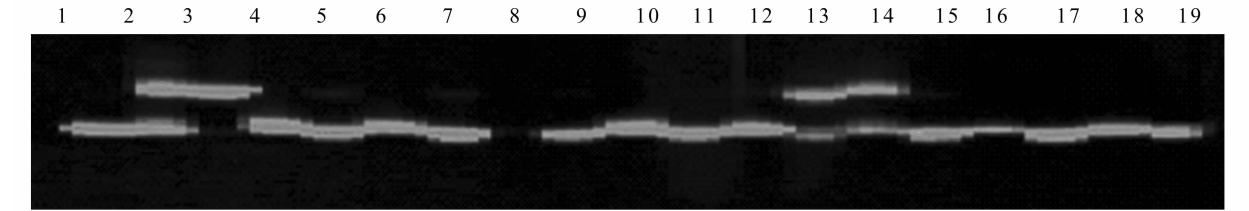


图4 与家蚕幼虫鹑斑基因*q*连锁的SSR标记S0710 在 BC<sub>1</sub>M 鹑斑群体中扩增的局部电泳图谱

2.5 构建遗传连锁图

采用作图软件 Mapmaker 3.0,绘制家蚕 *q* 基因与 3 个具有多态性的 SSR 标记之间的遗传连锁图(图 5)。可见在第 7

C108 和 F<sub>1</sub> 为模板,选取第 7 连锁群中在 C108 与 g03 之间有多态的 SSR 标记引物进行 PCR 扩增。结果所有标记在 11 个普斑个体中的带型与 F<sub>1</sub> 表现带型一致,出现 2 条带,全部为杂合型,11 个鹑斑个体的带型则与 g03 带型相同,为纯合型的 1 条带(图 2)。泳道 12、13 和 14 分别是亲本 g03、C108 和 F<sub>1</sub>,SSR 标记 S0710 在 2 个亲本间具有多态性,且在 F<sub>1</sub>(泳道 14)上共显性地表现出来。BC<sub>1</sub>F 群体中的 11 个鹑斑个体(泳道 1 ~ 11)带型一致并且与 g03 相同,出现 1 条带;BC<sub>1</sub>F 群中的 11 个普斑个体(泳道 15 ~ 25)全部 2 条带,带型与 F<sub>1</sub> 一致。根据孟德尔遗传规律,F<sub>1</sub> 以及 BC<sub>1</sub>F 群中的普斑个体的基因型为  $-+^p/q +^q$ ,杂合型;而该群体中的鹑斑个体及亲本 g03 的基因型应该为  $-+^p/qq$ ,鹑斑基因 *q* 为纯合型。这与 SSR 标记 S0710 的电泳图谱完全一致,说明 *q* 基因与 S0710 连锁,结果与形态遗传学研究结果一致,证实了 *q* 基因位于第 7 连锁群上。

与亲本 g03 的带型相同,93 普斑个体的带型应与 F<sub>1</sub> 相同。如果 BC<sub>1</sub>M 群的雌性亲本在 *q* 基因与 SSR 位点之间发生了交换,相对应的个体的带型就与 F<sub>1</sub> 表现相同带型,普斑个体的带型则与亲本 g03 的带型相同。图 3 与图 4 为家蚕幼虫鹑斑基因 *q* 连锁的 SSR 标记 S0710 在 BC<sub>1</sub>M 普斑群体和鹑斑群体中扩增的局部电泳图谱。

连锁群上 3 个 SSR 标记及 *q* 基因的排列次序为 S0703、*q*、S0707、S0710。该 SSR 标记连锁图的遗传距离为 18.0 cM,离 *q* 基因最近的 SSR 标记为 S0703,遗传距离为 4.5 cM。

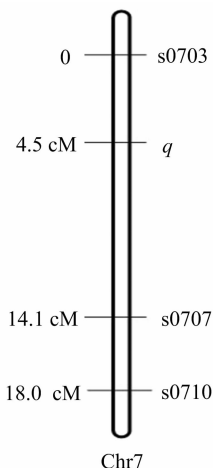


图5 家蚕幼虫鹵斑基因 $q$ 与 SSR 标记之间的遗传连锁图

### 3 讨论

鹵斑对正常型为隐性,通常与普斑共存。遗传学中常将第 2 染色体上的  $P$  群复等位基因作为基础斑纹,而将其他的斑纹基因,如  $Ze$ 、 $L$ 、 $q$ 、 $ms$  等作为附加斑纹<sup>[20]</sup>,附加斑纹间又相互组合成为二次附加斑纹、三次附加斑纹等。由于这些斑纹在稚蚕期表现不明显,因此饲养的  $BC_1F$  群体和  $BC_1M$  群体在分型时应选择在壮蚕期,一般为 5 龄第 4 天进行,以保证表型分型的准确性。本研究采用已公布的第 7 连锁群上的 SSR 标记对家蚕鹵斑  $q$  基因进行定位研究,共获得 3 个与  $q$  基因连锁的 SSR 标记,并构建了它们与  $q$  基因的遗传连锁图,该连锁图的遗传距离为 18.0 cM,与  $q$  基因最近的标记遗传距离为 4.5 cM。为了对  $q$  基因进行精细定位,我们利用 SSR Hunter 软件在家蚕基因组物理图上寻找 S0703 和 S0707 这 2 个标记间新的 SSR 分子标记,并随机选取位点设计了 42 对 SSR 引物,在 g03 和 C108 间进行多态性筛选,遗憾的是没有找到更多的有多态性的 SSR 标记。今后可能要借助 SNP 或者 Caps 等标记,以寻找与  $q$  基因紧密连锁的分子标记,精确定位和克隆  $q$  基因;或者更换其他携带鹵斑基因的品系,重新组配群体,进行  $q$  基因的图位克隆。

### 参考文献:

- [1] 向仲怀. 家蚕遗传育种学[M]. 北京:农业出版社,1994:15.
- [2] 浙江农业大学. 蚕体解剖生理学[M]. 北京:农业出版社,1981:23-29.
- [3] Wright T R. The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*[J]. *Advances in Genetics*, 1987, 24:127-222.
- [4] Wittkopp P J, True J R, Carroll S B. Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns[J]. *Development*, 2002, 129(8):1849-1858.
- [5] Futahashi R, Sato J, Meng Y, et al. *Yellow* and *Ebony* are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Genetics*, 2008, 180(4):1995-2005.
- [6] Dai F Y, Qiao L, Tong X L, et al. Mutations of an arylalkylamine -  $N$  - acetyltransferase, *Bm* - iAANAT, are responsible for silkworm melanism mutant [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(25):19553-19560.
- [7] Zhan S, Guo Q, Li M, et al. Disruption of an  $N$  - acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation[J]. *Development*, 2010, 137(23):4083-4090.
- [8] Ito K, Katsuma S, Yamamoto K, et al. A 25 bp - long insertional mutation in the *BmVarp* gene causes the waxy translucent skin of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(4):287-293.
- [9] Meng Y, Katsuma S, Daimon T, et al. The silkworm mutant lemon (lemon lethal) is a potential insect model for human sepiapterin reductase deficiency[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(17):11698-11705.
- [10] Wittkopp P J, Williams B L, Selegue J E, et al. *Drosophila* pigmentation evolution: divergent genotypes underlying convergent phenotypes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4):1808-1813.
- [11] 李 雪. 家蚕体色突变黑蛾 (*Bm*) 的分子定位及候选基因的筛选研究[D]. 重庆:西南大学, 2010:1-50.
- [12] Miao X X, Xub S J, Li M H, et al. Simple sequence repeat - based consensus linkage map of *Bombyx mori* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(45):16303-16308.
- [13] 李 斌, 鲁 成, 周泽扬, 等. RAPD 标记构建家蚕分子连锁图 [J]. *遗传学报*, 2000, 27(2):127-132.
- [14] 万春玲, 谭远德, 朱玉芳, 等. 利川 AFLP 技术构建家蚕分子标记连锁图谱[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(3):338-341.
- [15] Xia Q Y, Jun W, Zhou Z Y, et al. Finishing the silkworm genome: Insights into genome structure, gene evolution and biological process [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008(38):1035-1046.
- [16] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16):6463-6471.
- [17] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle *actin* gene [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44(3):397-401.
- [18] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. *Genomics*, 1987, 1(2):174-181.
- [19] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination-values [J]. *Annals of Eugenics*, 1944, 12(2):172-175.
- [20] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国养蚕学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1990:226.